

Molecular study on the functions of class B  
MADS-box genes controlling flower organs  
identity in Dendrobium orchid

著者	Sirisawat Supatida
内容記述	Thesis (Ph. D. in Agricultural Science)--University of Tsukuba, (A), no. 5522, 2010.4.30 Includes bibliographical references (leaves 100-109)
発行年	2010
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/114590">http://hdl.handle.net/2241/114590</a>

氏 名 (本籍)	スパティダ シリサワット (タ イ)			
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	博 甲 第 5522 号			
学位授与年月日	平成 22 年 4 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科			
学 位 論 文 題 目	<b>Molecular Study on the Functions of Class B MADS-Box Genes Controlling Flower Organs Identity in <i>Dendrobium</i> Orchid</b> (デンドロビウム属ランの花器官形成を制御するクラス B MADS-Box 遺伝子の機能に関する分子生物学的研究)			
主 査	筑波大学教授	博士 (農学)	江 面	浩
副 査	筑波大学准教授	博士 (農学)	福 田	直 也
副 査	筑波大学准教授	農学博士	大 澤	良
副 査	筑波大学准教授	博士 (理学)	小 野	道 之
副 査	明治大学准教授	農学博士	半 田	高

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

花は、被子植物の分類や系統進化を考える上での主要器官であり、また花卉園芸植物における最も重要な観賞部位である。近年、分子生物学的分析手法の発達により、花器官の決定に関与するホメオティック遺伝子群が次々と単離され、その構造や機能が明らかにされている。その結果、花のホメオティック遺伝子は、ABC クラスと称される 3 つのクラスに大きく分けられ、花の構造上 4 つに分けられる領域 (ウォール) の決定は、これら 3 つのクラスの遺伝子の働きから構築された ABC モデルで説明されている。ABC の 3 つのクラスのうち、特にクラス B 遺伝子は花弁 (ウォール 2) と雄ずい (ウォール 3) の形成に関係する重要な遺伝子である。多くの被子植物の中であって、ポリネーターとの密接な共進化の結果、単子葉植物として最も進化した植物群となったラン科植物は、ガク片 (外花被) と花弁 (内花被) が同様に発達して様々な形と色彩を持つ、花弁の一枚が唇弁とよばれる授粉に有利な構造に変化する、雌ずいと雄ずいが合着してずい柱とよばれる形態を持つ等、極めて特異的かつ多様な花構造を有している。したがって、ラン科植物のクラス B 遺伝子を研究することにより、ラン科植物が持つ花器官の多様性や進化について理解することが可能となる。

本研究で材料に用いたセッコク (*Dendrobium moniliforme*) は、東アジアに広く自生しているラン科植物最大の属であるセッコク属 (*Dendrobium*) のタイプ種であり、また、我が国を代表する古典園芸植物の一種として、これまでに数多くの花や葉の形態変異体が得られている。ラン科植物の持つクラス B 遺伝子は、これまでの研究から 2 つのサブファミリー (*AP3/DEF*, *PI/GLO*) に分けられ、さらに *AP3/DEF* サブファミリーは分子系統的に 4 つのクレードに分けられている。しかし、これまでにラン科植物から単離されたクラス B 遺伝子はごく一部の属や種に限られており、またその機能解析も限定的であった。本研究では新たにセッコクから 4 種類のクラス B 遺伝子 (*DMAP3A*, *DMAP3B*, *DMMADS4*, *DMPI*) を単離してその全長配列決定し、その後の詳細な解析に用いた。全長の塩基配列からは、本研究で単離した 4 種類の遺伝子のうちの 3 種類

(*DMAP3A*, *DMAP3B*, *DMMADS4*) は、単子葉植物に一般的なパレオ型の AP3 モチーフを C 末に持つ AP3/DEF 遺伝子で、それぞれクレード 1,3,4 に属していた。また、残りの 1 種類 (*DMPI*) は単子葉植物の *PI/GLO* 遺伝子と類似した配列であった。

セッコクの野生型の花を材料に用いた RT-PCR と量的 RT-PCR 解析の結果から、*DMAP3A* と *DMPI* は全ウォールで発現していた。一方、*DMAP3B* と *DMMADS4* はウォール 2, 3, 4 のみで発現しており、更に *DMAP3B* は子房では発現が見られなかった。これまでにラン科植物で単離されたクラス B 遺伝子は、いずれも全ウォールで発現していたことから、セッコクのようにラン科植物の中にはクラス B 遺伝子の発現がウォールによって異なるものもあることが今回の研究により明らかとなった。また、セッコクのガク片が花弁化した変異体のうち、完全六弁花の「弦上」はウォール 1 とウォール 2 の両方で同程度に *DMPI* が発現していたことから、*DMPI* の発現強度と表現型との関係が推察された。

酵母 2 ハイブリッド分析からは、*DMMADS4* と *DMPI* の間で強いシグナルが観察されたことから、他の植物から単離されたクラス B 遺伝子で一般的に提唱されているのと同様に、セッコクで見つかったこれら 2 遺伝子間においてもヘテロダイマー形成が可能であることが示唆された。更に、*DMMADS4* 同士においても弱いシグナルが見られたことから、*DMMADS4* はホモダイマーも形成できることがわかった。

シロイヌナズナの形質転換系を用いた実験からは、*DMAP3B* と *DMMADS4* の過剰発現形質転換体では野生型と比べて変化がなかったのに対し、*DMPI* の過剰発現形質転換体ではガク片が一部花弁化する、開花期間が長くなる、子実形成が遅れる等の形態変化が観察された。また、*DMAP3B* と *DMMADS4* の過剰発現形質転換体を *DMPI* の過剰発現形質転換体と交配して得られた後代では、ガク片の花弁化はより完全になり、さらにウォール 4 の心皮形成が阻害され、葉にも湾曲変形が観察されるなど明らかに野生型や *DMPI* 単独の過剰発現形質転換体とは異なる形態となった。このことは、先の酵母 2 ハイブリッド分析で予想された 2 遺伝子間のヘテロダイマー形成により、クラス B 遺伝子が完全になった結果、強発現したためであると考えられた。

以上により、デンドロビウム属ランの花器官形成を制御するクラス B MADS-Box 遺伝子の機能に関する新たな知見が得られた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請論文は、植物の多様性や進化を考える上で、また園芸植物としても重要なラン科植物の一種であるセッコクから、花の器官形成に係るホメオティック遺伝子のクラス B 遺伝子を新たに 4 種類単離し、その構造と機能について解析した。特に、完全長の塩基配列の分析と、変異体も用いた詳細な発現解析により、多様なラン科植物の中にはセッコクのようにウォールで発現が異なるクラス B 遺伝子を持つものがあることを明らかにし、被子植物におけるクラス B 遺伝子の進化を考える上で新たな情報を提供することができた。また、酵母 2 ハイブリッド分析や形質転換体を用いた解析からは、ラン科植物のクラス B 遺伝子間においてもヘテロダイマー形成が生じること、クラス B 遺伝子の機能が完全になることが明確に証明された。今回クローニングされたクラス B 遺伝子は、今後複雑なランの花の構造が形成される過程を明らかにする研究や、ラン科植物への遺伝子導入で人為的にランの花器官を変化させた育種素材を作成すること等にも利用することが可能である。これらは学術上かつ農業上からも非常に有益であり、本論文は十分に博士論文として審査に値するものと認めた。

以上のように本研究で得られた新しい知見と技術は、植物における形態形成と進化を研究し、さらには園芸植物としてその育種利用を模索する上で極めて重要であり、学術上の価値は大きい。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。